

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Polina Yershova

VÝVOJ VOLTAMETRICKÝCH METOD PRO DETEKCI
CHOLESTEROLU NA BÓREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ
ELEKTRODĚ

Development of voltammetric methods for detection of
cholesterol on boron-doped diamond electrode

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Karolína Schwarzová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Jan Klouda

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 22.08.2018

Abstrakt

Cholesterol patří mezi nejvýznamnější steroly v lidském organismu. Tvoří podstatnou část plazmatické membrány a je výchozí sloučeninou pro biosyntézu dalších steroidních látek: žlučových kyselin, steroidních hormonů a vitamínu D. Do organismu se cholesterol dostává buď vstřebáváním ze zažívacího traktu, nebo je syntetizován *de novo* z acetyl-CoA. Poruchy homeostázy cholesterolu mohou způsobit celou řadu onemocnění, například cholesterol vázaný v lipoproteinu o nízké hustotě je nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro vznik aterosklerózy.

Cílem této bakalářské práce bylo vyhodnotit využitelnost přímé elektrochemické oxidace cholesterolu po aktivaci dehydratačními reakcemi pro elektroanalýzu. Měření probíhala ve směsném prostředí acetonitril:kyselina chloristá:voda za použití cyklické, diferenční pulzní (DPV) a *square wave* voltametrie (SWV). Jako pracovní elektroda byla použita bórem dopovaná diamantová elektroda. Měření prokázala, že cholesterol poskytuje ireverzibilní anodický signál, který je v čase stabilní. Změna základního elektrolytu ukázala, že signál je pozorován pouze v přítomnosti silné kyseliny.

Meze detekce pro metody DPV a SWV byly v řádu koncentrací 1×10^{-6} mol l⁻¹.

Klíčová slova

bórem dopovaný diamant, cholesterol, dehydratace, steroidy, voltametrie

Abstract

Cholesterol is one of the most important sterols in the human body. It forms an essential part of the cell membrane and it is the starting compound for the biosynthesis of other steroid substances: bile acids, steroid hormones, and vitamin D. Cholesterol is either absorbed from the digestive tract or synthesized de novo from acetyl-CoA. Disorders of cholesterol homeostasis can cause a variety of diseases, for example, low-density lipoprotein cholesterol is the most important risk factor for atherosclerosis.

The goal of this bachelor's work was to evaluate the applicability of direct electrochemical oxidation of cholesterol after dehydration reactions for electroanalysis. Measurements were carried out in mixed medium acetonitrile:perchloric acid:water using cyclic, differential pulse (DPV), and square wave voltammetry (SWV). A boron-doped diamond electrode was used as the working electrode. Measurement showed that cholesterol provides an irreversible anodic signal that is stable over time. The change in the base electrolyte showed that the signal is observed only in the presence of a strong acid.

Limit detection for DPV and SWV methods was at a concentration of $1 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$.

Key words

Boron-doped diamond, cholesterol, dehydration, steroids, voltammetry

Tento výzkum byl proveden v rámci specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260440).

Tato práce vznikla s podporou Grantové agentury České republiky (projekt 18-01710S) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt GAUK 1440217).

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce, paní doktorce Schwarzové za cenné rady, za její trpělivost a čas, který mi věnovala při práci v laboratoři i při sepisování práce. Děkuji taky Mgr. Janu Kloudovi za všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci. Dále bych ráda poděkovala své rodině za podporu a umožnění studia.

Obsah

Seznam zkratk.....	8
1. Teoretická část.....	9
1.1 Cíl práce.....	9
1.2 Cholesterol.....	9
1.2.1 Struktura a formy cholesterolu.....	9
1.2.2 Výskyt cholesterolu.....	9
1.2.2.1 Cholesterol z potravy.....	10
1.2.2.2 Biosyntéza cholesterolu.....	11
1.2.3 Lipoproteiny.....	11
1.2.3.1 Chylomikrony.....	13
1.2.3.2 VLDL.....	14
1.2.3.3 IDL.....	14
1.2.3.4 LDL.....	14
1.2.3.5 HDL.....	14
1.2.4. Význam cholesterolu v organismu.....	14
1.2.4.1 Žlučové kyseliny.....	15
1.2.4.2 Steroidní hormony.....	15
1.2.4.3 Vitamin D.....	16
1.2.5 Biologické hodnoty hladiny cholesterolu.....	16
1.2.6 Analytické metody stanovení cholesterolu.....	17
1.2.6.1 AOAC metoda.....	17
1.2.6.2 Enzymatické metody.....	17
1.2.6.3 Spektrofotometrické stanovení.....	18
1.2.6.4 Stanovení pomocí HPLC.....	18
1.2.7 Elektrochemie cholesterolu.....	18
1.3 Bórom dopovaná diamantová elektroda.....	19
2. Experimentální část.....	21
2.1 Studovaná látka.....	21
2.2 Použité chemikálie.....	21
2.3 Příprava zásobního roztoku cholesterolu.....	21
2.4 Metody měření a zpracování dat.....	21
2.4.1 Voltametrická měření.....	21
2.4.2 Zpracování dat.....	22
3. Výsledky a diskuze.....	23
3.1 Optimalizace procesu elektrochemické oxidace cholesterolu.....	23
3.1.1 Závislost pvoltametrické odezvy na obsahu vody.....	24
3.1.2 Časová závislost voltametrické odezvy.....	25
3.1.3 Závislost voltametrické odezvy na použitém základním elektrolytu.....	27
3.2 Koncentrační závislost cholesterolu.....	28
Závěr.....	32
Literatura.....	33

Seznam zkratek

AOAC	Association of Analytical Communities
BDD	borem dopovaný diamant
c	molární koncentrace [mol l^{-1}]
CV	cyklická voltametrie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
E	potenciál [V]
GC	plynová chromatografie
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
I	proud [μA]
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
LPL	lipoprotein lipáza
s	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka
SWV	<i>square wave</i> voltametrie
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě

1. Teoretická část

1.1. Cíl práce

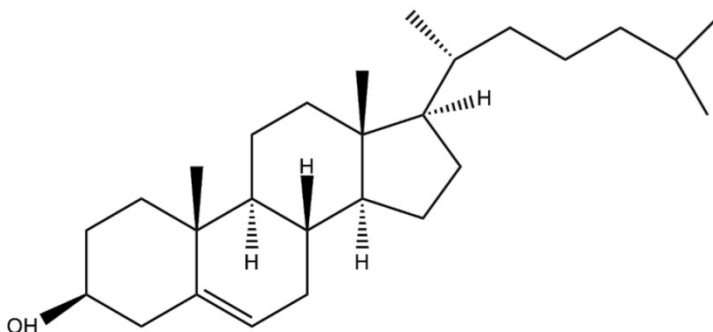
Tato bakalářská práce si kladla za cíl vyhodnotit využitelnost elektrochemické oxidace cholesterolu ve směsném prostředí acetonitril:kyselina chloristá:voda na borem dopované diamantové elektrodě pro elektroanalýzu. Předpokládá se, že v tomto prostředí dochází nejprve k dehydratační reakci a následně jsou oxidovány produkty nebo meziprodukty této dehydratace.

1.2. Cholesterol

1.2.1. Struktura a formy cholesterolu

Cholesterol patří mezi nejvýznamnější steroly v lidském organismu. Sumární vzorec cholesterolu je $C_{27}H_{46}O$. Obsahuje nezaměnitelnou strukturu cyklopentanofenanthrenu a hydroxylovou skupinu na uhlíku C_3 , která způsobí amfifilní povahu molekuly – obsahuje hydrofilní a hydrofobní část (1), přičemž z obrázku 1.1 je zřejmé, že hydrofobní část je dominantní.

První izolaci cholesterolu z lidských žlučových kamenů provedli Francouzi Poulletier de la Salle (1769) a A.F. de Fourcroy (1789) (2). Z formy, ve které byl objeven vzniklo označení „cholesterol“, z řeckého slova *chole* (žluč) a *stereos* (pevný).



Obr. 1.1. Strukturní vzorec cholesterolu. Převzato z <https://cs.wikipedia.org/wiki/Cholesterol>

1.2.2. Výskyt cholesterolu

V organismu se cholesterol nachází jako volný nebo jako esterifikovaný. Esterifikované formy se liší navázanou mastnou kyselinou na hydroxylovou skupinu cholesterolu. Tyto

kyseliny jsou nejčastěji nenasycené. Esterifikovaný cholesterol tvoří dvě třetiny z celkového cholesterolu v plazmě a má podstatnou funkci – je zásobní a transportní formou cholesterolu.

Cholesterol je nepostradatelným lipidem, který je přítomen v krvi. Je také základním komponentem cytoplazmatické membrány eukaryotů (2).

Cholesterol se do organismu dostává buď z potravy nebo se syntetizuje v organismu *de novo* z acetyl-CoA.

1.2.2.1. Cholesterol z potravy

Potrava živočišného původu je bohatá na cholesterol. Zejména maso, vnitřnosti, uzeniny, vejce, mléčné výrobky a živočišné tuky. Přehled potravin bohatých na cholesterol je uveden v tabulce 1.1.

Tab. 1.1 Množství tuku a cholesterolu ve vybraných potravinách (6)

Potravina	Obsah tuku g/100 g	Obsah cholesterolu g/100 g
Maso a masové výrobky		
Vepřové libové	17.7	0.071
Vepřové stehno	14.1	0.070
Hovězí libové	5.9	0.080
Hovězí stehno	7.7	0.120
Párky	24.5	0.077
Bílé klobásy	16.9	0.100
Vnitřností		
Vepřová játra	4.8	0.340
Hovězí játra	3.9	0.270
Vejce a vaječné výrobky		
Žloutek	32.1	1.636
Vejce	11.7	0.438
Majonéza	86.0	0.075
Mléko a mléčné výrobky		
Mléko plnotučné	3.4	0.006
Mléko polotučné	2.0	0.005
Smetana ke šlehání	33.7	0.109
Tvaroh měkký tučný	11.4	0.037

Tuky nacházející se v potravě lze rozdělit na dvě skupiny: nasycené a nenasycené. Nasycené tuky zvyšují hladinu celkového a cholesterolu vázaného v lipoproteinu o

nízké hustotě (LDL cholesterol). Nejvíc nasycených tuků je v másle, sádle a masných výrobcích. Rostlinné oleje, tučné ryby a veškeré druhy ořechů naopak obsahují nenasycené tuky, které pomáhají snížit hladinu LDL cholesterolu (7).

Cholesterol, přijatý z potravy, se nakonec odbourává v játrech.

1.2.2.2. Biosyntéza cholesterolu

Tato biosyntéza probíhá ve všech buňkách s výjimkou bezjaderných erytrocytů, především pak v hepatocytech. Vyšší aktivitu při biosyntéze cholesterolu vykazují také střeva, nadledviny a reprodukční orgány. Biosyntéza probíhá v cytoplasmě a mitochondriích, přičemž výchozí látkou je acetyl-CoA, který vzniká při oxidaci mastných kyselin v mitochondriích.

Biosyntézu cholesterolu je možné rozdělit na 4 fáze:

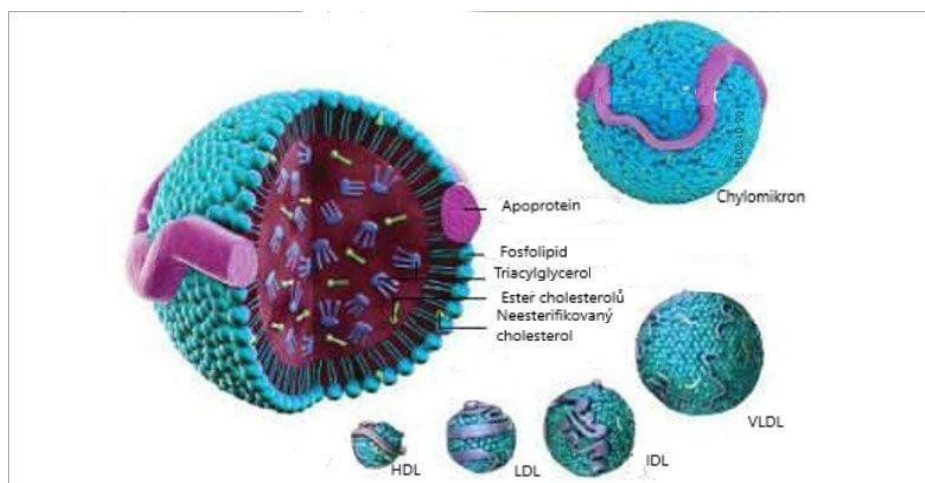
1. Syntéza mevalonátu z acetyl- CoA
2. Vznik aktivního izoprenu (izopentenylidifosfátu)
3. Přeměna izopentenylidifosfátu na skvalen
4. Transformace skvalenu na cholesterol (4).

Pro řízení metabolismu cholesterolu je klíčovým první krok biosyntézy. Jednou z přeměn tohoto kroku je syntéza hydroxymethylglutaryl CoA, který je konvertován enzymem HMG-CoA reduktázou na mevalonát. Významnými inhibitory tohoto enzymu jsou hypolipidemika, vlivem kterých je potlačena syntéza cholesterolu.

1.2.3. Lipoproteiny

Cholesterol je ve vodě nerozpustný, proto je v krevním řečišti transportován ve formě lipoproteinů (3).

Lipoproteiny jsou tvořeny z hydrofobního jádra a hydrofilního obalu. Nepolární triacylglyceroly a esterifikovaný cholesterol spolu formují jádro, obal je složen z fosfolipidů a bílkovin, které se nazývají apoproteiny (8). Složení jednotlivých druhů lipoproteinů se může měnit přenášením jejich součástí z jedné částice na druhou. Struktura lipoproteinů a jednotlivé druhy jsou uvedené na obrázku 1.2.



Obr. 1.2 Struktura lipoproteinů a jejich druhy. Převzato a upraveno z <http://healthy-ojas.com/cholesterol/lipoprotein.html>

Každý druh lipoproteinu má charakteristické složení apoproteinů. Apoproteiny plní následující funkce:

- strukturní komponent lipoproteinů
- transport hydrofobních lipidů v plazmě
- aktivace enzymů modifikujících lipoproteiny
- syntéza a sekrece specifických lipoproteinů
- odstranění lipoproteinů z krevního oběhu navázáním na specifické receptory buněk (9).

Lipoproteiny se dělí na základě odlišné hustoty, závislé na poměru lipidové a bílkovinné složky:

- chylomikrony
- lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL)
- lipoproteiny o střední hustotě (IDL)
- lipoproteiny o nízké hustotě (LDL)
- lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL).

Mezi hustotou částic a jejich velikostí je nepřímá úměra, což znamená, že se stoupající hustotou se jejich velikost zmenšuje. Hustoty jednotlivých typů lipoproteinů, jejich průměr, zdroj a zastoupení jednotlivých součástí jsou uvedené v tabulce 1.2.

Tab. 1.2 Typy lipoproteinů, jejich zdroj, hustota a chemické složení (8,11).

Typ lipoproteinů	Průměr nm	Hustota g/ml	Zdroj	Zastoupení				
				% P	TG	PL	CE	CH
chylomikrony	100-1000	cca 0,980	tenké střevo	2	90	5	2	1
VLDL	30-90	cca 1,006	játra	10	54	16	13	7
IDL	25-30	1,006-1,019	katabolismus VLDL	17	20	20	34	9
LDL	20-25	1,019-1,063	katabolismus IDL	23	4	21	41	11
HDL	5-12	1,063-1,210	játra, tenké střevo	35-55	3-5	28-33	12-17	3-5

VLDL – lipoproteiny o velmi nízké hustotě; IDL – lipoproteiny o střední hustotě; LDL – lipoproteiny o nízké hustotě; HDL – lipoproteiny o vysoké hustotě; P – proteiny; TG – triacylglyceroly ; PL – fosfolipidy; CE – esterifikovaný cholesterol; CH – volný cholesterol.

Jiným kritériem dělení lipoproteinů je jejich elektroforetická pohyblivost. Rozdělují se tak na:

- chylomikrony;
- β -lipoproteiny (odpovídající LDL);
- pre- β -lipoproteiny (odpovídající VLDL);
- α -lipoproteiny (odpovídající HDL) (8).

Principem této klasifikace je pohyblivost lipoproteinů při elektroforéze za využití agarózového gelu, která závisí na rozdílné velikosti náboje bílkovin. Nejpohyblivější jsou α -lipoproteiny. Naopak, chylomikrony nejsou pohyblivé vůbec a zůstávají na startu.

1.2.3.1. Chylomikrony

Chylomikrony jsou největší lipoproteiny s nejnižší hustotou. Transportují exogenní triacylglyceroly a cholesterol z tenkého střeva do ostatních tkání. Vznikají pouze po příjmu potravy. V krevním oběhu dochází ke štěpení chylomikronů lipoprotein lipázou (LPL), která je součástí membrány endotelu kapilár. Uvolněné mastné kyseliny se ukládají v tukové tkáni (syntetizují se z nich zásobní triacylglyceroly) a slouží jako zdroj energie hlavně pro svaly (8).

1.2.3.2. VLDL

VLDL se tvoří v hepatocytech, obsahují cholesterol, proteiny a fosfolipidy, které byly syntetizované v játrech. Úkolem VLDL je poskytování volných mastných kyselin svalům a tukovým buňkám.

1.2.3.3. IDL

Lipoproteiny o střední hustotě vznikají přenášením apoC a apoE do HDL v plazmě. IDL jsou částečně vychytány játry a metabolizovány, zbytek je přeměněn na LDL.

1.2.3.4. LDL

LDL částice obsahují velké množství esterů cholesterolu, jejich povrch tvoří volný cholesterol, fosfolipidy a apoprotein B-100, prostřednictvím kterého se LDL částice vážou na membránový receptor. Po navázání dojde k pinocytóze a následné degradaci apoproteinu B-100 i hydrolyzaci esterů cholesterolu. Díky tomuto procesu se cholesterol dostává do buňky a může být uložen jako zásobní cholesterol nebo se stát součástí buněčných membrán. Pokud se dostává do hepatocytu je vyloučen do žluči (8). Poškození apoB nebo jeho receptorů vede k nadbytku LDL částic v krevním řečišti. Zvýšená koncentrace LDL je signálem pro periferní tkáň produkovat víc cholesterolu, což přivádí k jeho ukládání do ateromových plátů a způsobuje aterosklerózu (5).

1.2.3.5. HDL

HDL částice jsou schopné vychytávat cholesterol z cév a transportovat ho zpět do jater, kde je metabolizován nebo vyloučen se žlučí. Existuje několik typu HDL, které se liší zastoupením jednotlivých lipidů.

1.2.4. Význam cholesterolu v organismu

V posledních deseti letech byl ve veřejném mediálním prostoru zdůrazňován negativní vliv samotného cholesterolu na zdraví. Kvůli tomuto omylu byl v marketingu některých potravin zavádějícím způsobem zdůrazňován nízký obsah cholesterolu. Avšak vliv cholesterolu, přijatého z potravy není rozhodujícím faktorem. Riziko je způsobeno metabolismem cholesterolu (17). Při vzniku, syntéze, transportu, odbourávání a vylučování může v lidském organismu dojít k zásadním poruchám s důsledky

vedoucími ke vzniku různých onemocnění. Cholesterol je však pro fungování lidského organismu nezbytnou sloučeninou.

Cholesterol tvoří podstatnou část plazmatické membrány a zabezpečuje její fluiditu a permeabilitu. Díky hydrofobní části molekuly cholesterol snižuje tekutost membrány a brání pasivnímu transportu vody (1).

Hydrofobnost cholesterolu je zásadní pro správné fungování nervových buněk. Tvoří 10% celkové hmoty mozku a je součástí myelinových obalů nervových buněk (14). Metabolickou degradaci cholesterolu v játrech vznikají žlučové kyseliny, které jsou podstatné pro podporu trávení. Cholesterol je rovněž výchozí sloučeninou pro biosyntézu jiných steroidních látek, například steroidních hormonů a vitamínu D (2).

1.2.4.1. Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny jsou steroidní látky. V játrech degradací cholesterolu vznikají primární žlučové kyseliny, mezi něž patří cholová a chenodeoxycholová kyselina. Tyto kyseliny jsou ve žluči konjugované s glycinem nebo taurinem. Po vzloučení do střeva se z primárních žlučových kyselin činností bakterií vznikají sekundární, jako například litholová a deoxycholová kyselina.

Žlučové kyseliny pomáhají při trávení tuků. Působí jako emulgátory tuků ve střevě, rozdělují kapky tuků do mikroskopických kapiček, což zvětšuje celkový povrch a tím i celkovou plochu kontaktu tuku s enzymem. Dalšími funkcemi žlučových kyselin při trávení jsou:

- přeměna prolipázy na účinnou lipázu;
- aktivace cholesterolesterázy;
- podpora vstřebávání vitaminů rozpustných v tucích.

Denní produkce žlučových kyselin u člověka je 20-30 g. Kolem 10 % z toho se vylučuje stolicí a zbytek je resorbován ve terminálním ileu a vrácen do jater (tzv. enterohepatální oběh) (18).

1.2.4.2. Steroidní hormony

Steroidní hormony mají lipofilní povahu. Proces přeměny cholesterolu na steroidní hormony se jmenuje steroidogeneze. Jejich syntéza se zvyšuje podle potřeby. Mohou být transportovány krví buď ve volné formě nebo navázané na plazmatické bílkoviny. Mechanismus působení je přes intracelulární receptory, které působí jako transkripční faktory.

Mezi steroidní hormony patří kortikosteroidy a pohlavní hormony.

Kortikosteroidy vznikají v buňkách nadledvin, jejich sekrece je řízena adenokortikotropním hormonem. Dělí se na tři skupiny:

1. Glukokortikoidy, které regulují metabolismus sacharidů a bílkovin;
2. Mineralkortikoidy, které ovlivňují metabolismus mineralů a vody;

Pohlavní hormony jsou zodpovědné za správný vývoj a funkci pohlavních orgánů, vývoj specifických sekundárních pohlavních znaků a sexuální chování. Dělí se na primárně mužské a primárně ženské. Mužské se nazývají androgeny a patří mezi ně například testosteron, ženské se nazývají estrogeny a patří mezi ně například estradiol či estriol (15).

1.2.4.3. Vitamin D

Vitamin D nebo kalciferol je prekurzorem pro syntézu kalcitriolu, který reguluje metabolismus vápníku a fosforu v organismu. Přírodní vitamin je označován jako cholecalciferol (D_3) a tvoří se působením ultrafialového záření (UVB, nikoliv UVA) v kůži ze 7-dehydrocholesterolu. Rozdíl mezi UVA a UVB zářením spočívá ve vlnové délce: UVA 400-320 nm, UVB 320-280 nm.

Dalším zdrojem vitaminu D jsou potraviny, zejména rybí tuk, játra, vaječní žloutek a mléko.

Druhou formou vitaminu D je ergokalciferol (D_2), který má rostlinný původ. Má stejné účinky jako cholecalciferol.

Kalciferol je významný při resorpci vápníku a fosfátu ze střeva a podporuje tím optimalizaci jejich hladiny. Nedostatek vitaminu D vede k porušení ukládání vápníku do kostí a jejich deformací. Klinickými projevy deficitu vitaminu D jsou křivice u dětí a osteomalacie u dospělých.

1.2.5. Biologické hodnoty hladiny cholesterolu

Hladina cholesterolu v krvi se nazývá cholesterolemie a závisí na věku, pohlaví, genetice, životním stylu a stravě. V tabulce 1.5 jsou uvedeny hodnoty celkového cholesterolu, LDL a HDL cholesterolu. Hodnoty nad tyto meze se považují za zvýšené a tento stav se nazývá hypercholesterolemií. Zvýšené hodnoty mohou být způsobené příjmem stravy bohaté na tuky a cholesterol. Hypercholesterolemií mohou také trpět vegetariáni, kteří mají sníženou koncentraci vitaminu B_{12} .

Zvýšená hladina LDL cholesterolu je rizikovým faktorem především pro vznik aterosklerózy, která je hlavní příčinou kardiovaskulárních chorob a cévní mozkové příhody (2).

Vyšší hladina HDL-cholesterolu chrání organismus před onemocněními srdce. Lze ji udržovat zdravým životním stylem.

Zdraví škodlivou je také hypocholesterolemie. Nedostatek cholesterolu může vyvolat snížení činnosti srdce, měknutí kosti a vyšší náchylnost k zánětům, a to nesprávným fungováním fagocytujících buněk (17).

Tab 1.5 Meze uváděné ve Velkém lékařském slovníku (16).

parametr	koncentrace mmol l ⁻¹
celkový cholesterol	do 40 let: 3,1-5,2 nad 40 let: 3,8-5,8
HDL cholesterol muži	1,1-2,1
HDL cholesterol ženy	1,1-2,1
LDL cholesterol muži	do 25 let: 1,5-3,9 22-55 let: 2,2-4,5 nad 55 let: 2,2-4,3
LDL cholesterol ženy	do 25 let: 1,5-3,7 22-55 let: 2,2-4,2 nad 55 let: 2,2-4,5

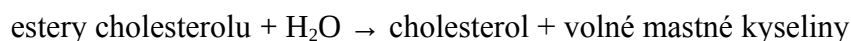
1.2.6. Analytické metody stanovení cholesterolu

1.2.6.1. AOAC (Association of Analytical Communities) oficiální metoda pro stanovení cholesterolu v potravě

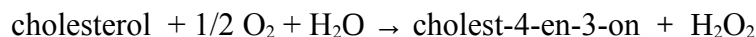
Principem je saponifikace extraktu lipidů ze vzorků při vysoké teplotě pomocí roztoku KOH v ethanolu, následná extrakce toluenem nezmýdelněné frakce obsahující cholesterol a další steroly. Steroly jsou derivatizovány na trimethylsilyl estery a poté kvantifikovány pomocí GC (10) s plamenovým ionizačním detektorem (30).

1.2.6.2. Enzymatické metody

Počáteční reakcí je hydrolýza esterů cholesterolu a následná oxidace volného cholesterolu. V prvním kroku cholesterolesterasa katalyzuje reakci:



Následuje reakce katalyzována cholesteroloxidasou:



Reakce se vzniklým peroxidem poskytuje červený komplex, který se měří spektrofotometricky při 500 nm:



Peroxidázovou reakci mohou interferovat redukující látky (např. vitamin C) (12).

1.2.6.3. Spektrofotometrické stanovení (Liebermannova-Buchardova reakce)

Principem Liebermannovy-Burchardovy reakce je odštěpení molekuly vody z cholesterolu v přítomnosti kyseliny sírové a kyseliny octové za vzniku karbonylového kationtu 3,5-cholestadienu. Jeho následnou oxidací pomocí acetanhydridu dochází ke vzniku tmavě zeleného pentaenylového kationtu s absorpčním maximem při 620nm (20,21).

1.2.6.4. Stanovení pomocí HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie zahrnuje separace, kvantifikace a stanovení různých složek přítomných ve směsi. Vzorek je mobilní fází unášen chromatografickou kolonou obsahující stacionární fází. Každá ze složek vzorku je v dynamické rovnováze mezi mobilní a stacionární fází a po průchodu kolonou jsou při vhodně zvolených podmínkách jednotlivé analyty fyzicky rozdělené (13). Kvalitativní údaj je stanoven na základě času, který jednotlivé složky vzorku stráví v koloně neboli retenčního času. Koncentraci analytu je možné stanovit například za pomoci kalibrační křivky získané při měření standardů.

Pro stanovení cholesterolu se nejčastěji používají chromatografické kolony s reverzní fází a následující detektory: detektor s diodovým polem (DAD), UV nebo elektrochemické detektory. Jako mobilní fáze se využívá směs acetonitrilu s metanolem nebo vodou (13).

1.2.7. Elektrochemie cholesterolu

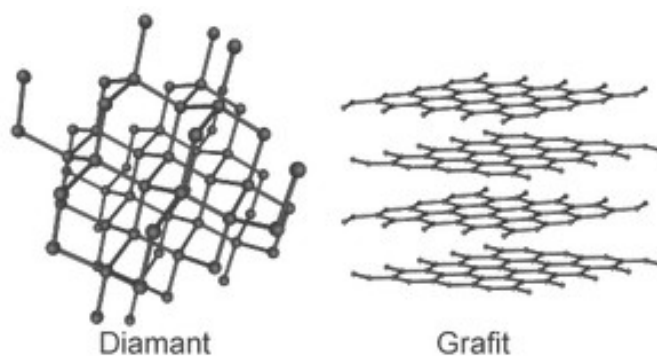
Přímá elektrochemie cholesterolu je poměrně neprobádanou vědní oblastí, jak je naznačeno v nedávno publikovaném přehledném článku (28). Na rozdíl od žlučových

kyselin obsahuje cholesterol ve své struktuře dvojnou vazbu mezi C_5 a C_6 , což zvyšuje jeho elektrochemickou reaktivitu a usnadňuje oxidaci. Dosáhnout oxidace je možné v prostředí s vysokou koncentrací organické fáze nebo za pomoci mediátorového iontu (25). Klouda *et al.* potvrdili možnost elektrochemické oxidace chemicky aktivovaných žlučových kyselin, které po jednoduchém dehydratačním kroku za použití kyseliny chloristé v acetonitrilu poskytují ve své aktivované formě voltametrickou odezvu okolo +1,2 V vs. Ag/AgNO₃ (26). Aktivací se v tomto případě rozumí zavedení dvojně vazby do struktury žlučové kyseliny, čímž dojde ke zvýšení její elektrochemické aktivity. Zároveň byla ve stejné studii potvrzena možnost elektrochemické oxidace cholesterolu za obdobných podmínek, avšak mechanismus tohoto procesu nebyl navržen.

1.3. Borem dopovaná diamantová elektroda

Struktura diamantu podmiňuje jeho unikátní chemické a fyzikální vlastnosti, mezi které patří chemická stabilita a inertnost, extrémní tvrdost, vysoká elektronová pohyblivost a vysoká tepelná vodivost (23,24). Na rozdíl od ostatních uhlíkových materiálů je diamantová mřížka složena z sp^3 hybridizovaných tetraedricky uspořádaných uhlíkových atomů (22). Grafit má jinou strukturu – skládá se z vrstev kondenzovaných sp^2 hybridizovaných uhlíku, tvořících šestiúhelníky (obr 1.3). Jednotlivé vrstvy jsou mezi sebou přitahovány slabými van der Waalsovými silami.

Diamant je přírodním izolátorem, proto nedopovaný diamant nelze použít jako elektrodový materiál. Bor, síra, dusík a fosfor snižují měrný odpor a proto se mohou používat jako dopovací prvky.



Obr. 1.3 Znárodnění struktury diamantu (sp^3) a grafitu (sp^2). Obrázek dostupný online z: <https://nomednina.wordpress.com/category/ak-9/hallbar-utveckling/page/3/>

Vývoj borem dopovaných diamantových (BDD) elektrod začal v osmdesátých letech 20. století. Od té doby se využívají pro elektroanalýzu, v Li-ionových bateriích a v diamantových biosensorech. Jako elektrodový materiál nabyl popularity až začátkem devadesátých let 20. století. Důležitými vlastnostmi BDD jako elektrodového materiálu jsou nízký zbytkový proud, mechanická a chemická stabilita, biokompatibilita a široké potenciálové okno (19).

2. Experimentální část

2.1. Studovaná látka

Byla studována elektrochemická oxidace cholesterolu. Látka byla zakoupena od firmy Sigma-Aldrich. Minimální deklarovaná čistota byla 99,98%.

2.2. Použité chemikálie

Ostatní použité chemikálie byly (pokud není udáno jinak) analytické čistoty: acetonitril ChromaSolv (Sigma-Aldrich, obsah vody pod 2×10^{-3} vol.%), bezvodý chloristan sodný pro HPLC (Fluka), dusičnan stříbrný Ph. Eur. 3 (Fluka), kyselina chloristá 70% (Sigma-Aldrich), kyselina sírová 95% (Lach-Ner, Neratovice, ČR), kyselina fosforečná 84-87% (Lach-Ner, Neratovice, ČR), kyselina dusičná 65% (Lach-Ner, Neratovice, ČR).

2.3. Příprava zásobního roztoku cholesterolu

Zásobní roztok cholesterolu o koncentraci 1×10^{-4} mol l^{-1} byl připraven přesným odvážením příslušného množství cholesterolu a jeho rozpuštěním v acetonitrilu.

2.4. Metody měření a zpracování dat

2.4.1. Voltametrická měření

Pro voltametrická měření byl použit Palmsens2 (Palm Instruments, Nizozemsko) a výrobcem dodaný software. Všechny experimenty byly provedeny ve smíšeném prostředí acetonitril: 0,1 mol l^{-1} kyselina chloristá, s minimálním obsahem vody (0,43%, obsažena v přidané $HClO_4$). Jako základní elektrolyt byla použita 0,1 mol l^{-1} $HClO_4$ v acetonitrilu. Studované roztoky byly složeny z 5 ml zásobního roztoku cholesterolu, 1 ml 1 mol l^{-1} roztoku kyseliny chloristé v acetonitrilu a 4 ml acetonitrilu. Výsledná koncentrace cholesterolu byla 5×10^{-5} mol l^{-1} a koncentrace $HClO_4$ 0,1 mol l^{-1} .

Pro studium elektrochemické oxidace cholesterolu byla zvolena metoda cyklické voltametrie (CV), pro měření koncentračních závislostí byly zvoleny metody DPV a SWV.

Měření probíhalo v potenciálovém rozmezí 0,4 až 2,0 V. Jako pracovní elektroda byla použita BDD elektroda ($d = 3$ mm; Windsor Scientific, Slough, Velká Británie). Před každým měřením byl povrch pracovní elektrody vyleštěn za použití suspenze Al_2O_3 .

(zrnitost 0,05 μm) v destilované vodě a leštící podložky (Elektrochemické detektory, Turnov, ČR).

Pro experimenty byla použita speciální elektrochemická cela s integrovanou referenční elektrodou, kterou byla Pleskovova nevodná referenční elektroda (stříbrný drátek ponořený v roztoku 0,01 mol l^{-1} AgNO_3 a 1 mol l^{-1} NaClO_4 v acetonitrilu). Od prostoru pracovní elektrody byla referenční elektroda oddělena meziprostorem obsahujícím 0,5 mol l^{-1} NaClO_4 . Pomocnou elektrodou byl platinový plíšek. Schématické znázornění elektrochemické cely je uvedeno v diplomové práci Kloudy (25).

Každé měření bylo provedeno nejméně třikrát. Pro prezentaci byly zvoleny druhé cykly měření.

2.4.2. Zpracování dat

Ke zpracování naměřených dat byly použity následující počítačové programy: OriginPro 2015 od firmy OriginLab Corporation (Northampton, MA, USA), Microsoft Excel od firmy Microsoft Corporation (USA).

3. Výsledky a diskuze

Praktická část této bakalářské práce je inspirována především zjištěními publikovanými Kloudou et al. a klade si za cíl na tuto studii navázat a rozšířit ji (26). V této studii, zaměřené především na elektrochemické chování chemicky aktivovaných žlučových kyselin bylo zároveň potvrzeno, že podobným způsobem lze oxidovat cholesterol či jeho produkty (více v kapitole 1.2.7.). Analogicky k navrženému průběhu chemické aktivace žlučových kyselin se lze domnívat, že dochází k dehydrataci molekuly cholesterolu, zavedení dvojných vazeb do jeho struktury a v důsledku k tvorbě produktu s vyšší elektrochemickou aktivitou, než vykazuje mateřská molekula cholesterolu. Schopnost silných anorganických kyselin dehydratovat cholesterol je ilustrována Liebermannovou-Burchardovou reakcí, kde dochází k dehydrataci cholesterolu v prostředí kyseliny sírové (27).

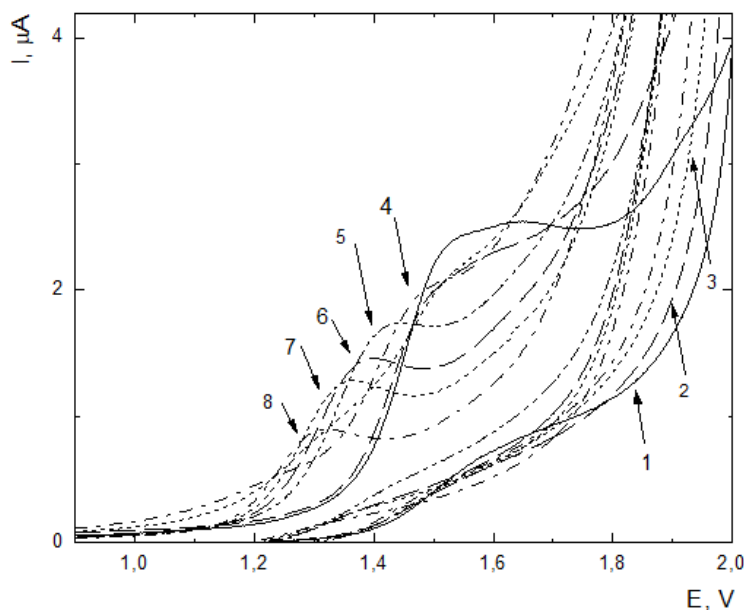
Měření probíhala na BDD elektrodě, a to kvůli vhodným vlastnostem tohoto materiálu pro organickou elektroanalýzu (29). V prvním kroku práce byly optimalizovány podmínky pro oxidaci cholesterolu. Experimenty nejprve na základě literatury probíhaly ve směsném prostředí acetonitril:kyselina chloristá:voda za využití kyseliny chloristé jako základního elektrolytu a případného chemického reagentu. Zároveň byla studována možnost použít i jiné silné kyseliny jako základního elektrolytu. Z důvodu časové nestability signálu žlučových kyselin (26) byla ověřena časová závislost voltametrické odezvy cholesterolu. Bylo také popsáno, že v případě žlučových kyselin může voda inhibovat dehydratační reakci, a proto byly provedeny experimenty se zvýšeným obsahem vody (26). Byla také ověřena možnost využití metody k analytickému stanovení cholesterolu sestrojením kalibračních závislostí za optimálních podmínek.

3.1. Optimalizace procesu elektrochemické oxidace cholesterolu

Na borem dopované diamantové elektrodě byl metodou cyklické voltametrie studován vliv vody na šíři potenciálového okna a průběh oxidačního procesu, závislost voltametrického signálu na čase od přípravy roztoku a také byly studovány možnosti použití jiných anorganických kyselin jako základního elektrolytu: kyseliny sírové, kyseliny dusičné a kyseliny fosforečné.

3.1.1. Závislost voltametrické odezvy na obsahu vody

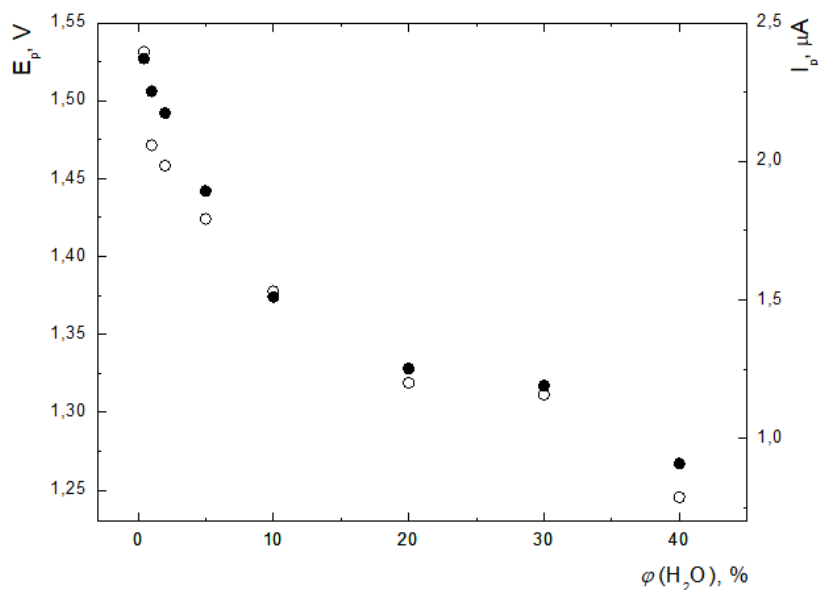
Pro studium závislosti velikosti voltametrické odezvy na obsahu vody byly připraveny roztoky s procentuálním zastoupením vody: 0,43 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % a následně byly podrobeny voltametrickému měření. Zaznamenané voltamogramy jsou zobrazeny na obrázku 3.1. Z nich je patrné že za daných podmínek dochází k ireversibilní anodické oxidaci cholesterolu mezi +1,3 a +1,6 V.



Obr. 3.1 Cyklické voltamogramy cholesterolu ($c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) s rozdílným obsahem vody v měřeném roztoku: (1) 0,43%, (2) 1%, (3) 2%, (4) 5%, (5) 10%, (6) 20%, (7) 30%, (8) 40%; Prostředí: acetonitril: 0,1 mol l^{-1} kyselina chloristá, obsahující 0,43% vody. Rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$ v acetonitrilu.

Lze konstatovat, že již minimální přídavek vody způsobí zkrácení potenciálového okna, jak se patrné z voltamogramů zobrazených na obrázku 3.1. Grafické znázornění vývoje potenciálu E_p a proudu I_p se stoupajícím zastoupením vody je uvedeno na obrázku 3.2. Výška voltametrické odezvy roztoku, obsahujícího 40 % vody výrazně klesla o 67,1 % z $2,395 \mu\text{A}$ na $0,787 \mu\text{A}$ ve srovnání s roztokem, který obsahoval nutných 0,43 % vody, pocházejících ze zásobního roztoku kyseliny chloristé. Na základě těchto dat se jeví jako nejvhodnější pro stanovení cholesterolu prostředí s minimálním obsahem vody. Potenciál píku se mezi stejnými roztoky snížil poměrně výrazně o 17,0 % z $1,527 \text{ V}$ na $1,267 \text{ V}$, čehož by bylo možné pozitivně využít pro

snížení interferencí při stanovení cholesterolu.



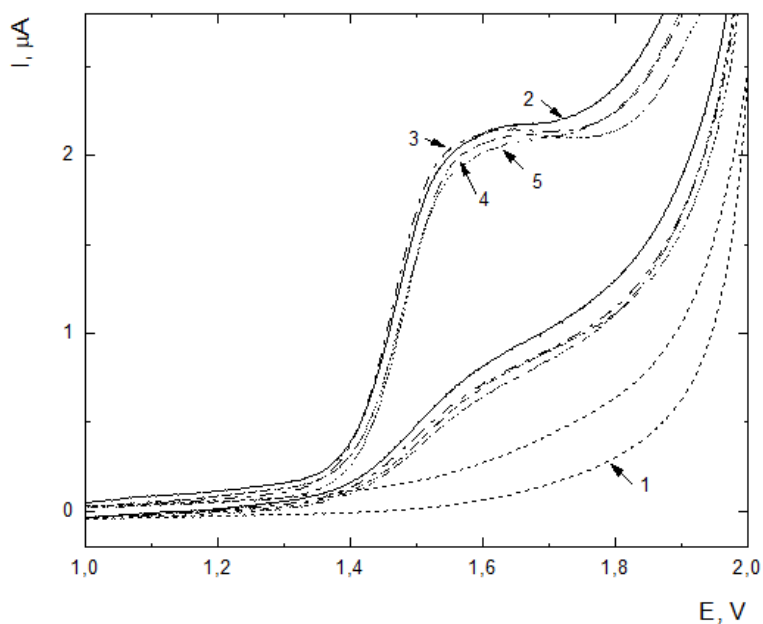
Obr. 3.2 Závislost (●) potenciálu E_p a (○) proudu píku I_p cholesterolu na procentuálním zastoupení vody ve směsi, naměřená pomocí CV ve smíšeném prostředí acetonitril: 0,1 mol l⁻¹ kyselina chloristá, obsahující 0,43% vody. Rychlost polarizace 50 mV s⁻¹, potenciál měřen proti Ag/0,01 mol l⁻¹ AgNO₃/1 mol l⁻¹ NaClO₄ v acetonitrilu.

3.1.2. Časová závislost voltametrické odezvy

Studována byla stabilita voltametrické odezvy v čase od přípravy studovaného roztoku.

Měření byla provedena v těchto časech (min): 0, 4, 10, 14, 18, 23, 28, 38, 46, 53.

Pro přehlednost nejsou na obrázku 3.3 znázorněna všechna naměřená data, ale jen 4 křivky pro: 0 min, 4 min, 14 min, 38 min. Z obrázku je patrné, že v čase nedochází k významnému posunu oxidačního potenciálu E_p . Oproti situaci pozorované při chemické aktivaci žlučových kyselin, kdy signál roste během několika desítek minut mnohonásobně, nedochází ani k výraznější změně v proudové odezvě I_p (26). Toto může poukazovat na výrazně rychlejší kinetiku dehydratační reakce v případě cholesterolu oproti žlučovým kyselinám, anebo na fakt, že pozorovaný signál odpovídá přímo cholesterolu a pro časovou proměnu signálu není důvod. Hledání odpovědi na otázku původu voltametrického signálu bude předmětem navazující práce, avšak evidentně přesahuje rámec této analyticky zaměřené bakalářské práce. Nicméně fakt, že je signál v čase stabilní, je pro analytickou praxi bezpochyby výhodou.



Obr. 3.3 Cyklické voltamogramy cholesterolu ($c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) v závislosti na čase od přípravy měřeného roztoku.: (1) základní elektrolyt, (2) 0 min, (3) 4 min, (4) 14 min, (5) 38 min; Prostředí: acetonitril: 0,1 mol l^{-1} kyselina chloristá, obsahující 0,43% vody. Rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , potenciál měřen proti Ag/0,01 mol l^{-1} AgNO_3 /1 mol l^{-1} NaClO_4 v acetonitrilu.

Relativní směrodatná odchylka ($n = 10$) potenciálu píku je v rozhraní 0,89 - 2,29 % a proudu v rozmezí 9,60 - 10,94 %. Průměrné hodnoty potenciálu a proudu, včetně intervalu spolehlivosti a směrodatné odchylky jsou uvedené v tabulce 3.1.

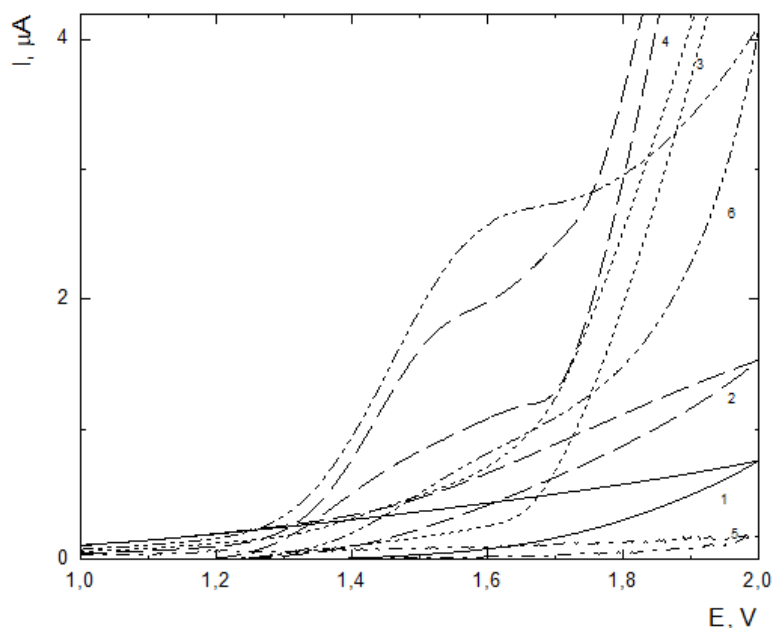
Tab.3.1 Vliv času od přípravy měřeného roztoku na potenciály E_p a proudy piků I_p cholesterolu. Intervaly spolehlivosti $L_{1,2}$ ($\alpha = 0,05$) a relativní směrodatné odchylky s_r pro 10 scanů.

	$E_p \pm L_{1,2}$ V	$s_r(E_p)$ %	$I_p \pm L_{1,2}$ μA	$s_r(I_p)$ %
1. scan	$1,524 \pm 0,025$	2,29	$1,861 \pm 0,147$	10,94
2. scan	$1,518 \pm 0,010$	0,89	$1,660 \pm 0,115$	9,60

3.1.3. Závislost voltametrické odezvy na použitém základním elektrolytu

Pro studium vlivu základního elektrolytu (a případného chemického reagentu) na voltametrickou odezvu cholesterolu byly mimo kyselinu chloristou zvoleny následující 0,1 mol l⁻¹ kyseliny: kyselina fosforečná, kyselina dusičná a kyselina sírová v acetonitrilu. Na obr. 3.4 jsou znázorněny voltamogramy základního elektrolytu a cholesterolu v přítomnosti výše uvedených kyselin, kdy obsah vody v měřených roztocích byl 0,04 % pro kyselinu sírovou, 0,17 % pro kyselinu fosforečnou, 0,34 % pro kyselinu dusičnou. V případě kyseliny sírové a kyseliny dusičné byla získána podobná odezva jako v přítomnosti kyseliny chloristé, tedy ireverzibilní anodický signál mezi potenciálem +1,5 V a +1,6 V. V prostředí kyseliny dusičné má voltametrický signál tvar vlny, což znesnadňuje jeho vyhodnocení. V prostředí kyseliny fosforečné nebyl pozorovaný žádný signál ve formě píku, pouze došlo okolo potenciálu +1,4 V k postupnému nárůstu proudu nad linii základního elektrolytu. Proudová odezva v přítomnosti kyseliny sírové byla 2,583 μA, což je o 7,85 % více než v přítomnosti kyseliny chloristé. V případě kyseliny dusičné pak byla 1,752 μA, což je o 26,85 % méně než v přítomnosti kyseliny chloristé.

Z těchto dat vyplývá, že signál je přítomen pouze v případě silnějších kyselin (sírová, dusičná). Toto zjištění naznačuje, že je skutečně třeba silné kyseliny jako reagentu, dochází k chemické reakci mezi cholesterolem a kyselinou a signál přísluší dehydratačnímu produktu cholesterolu.



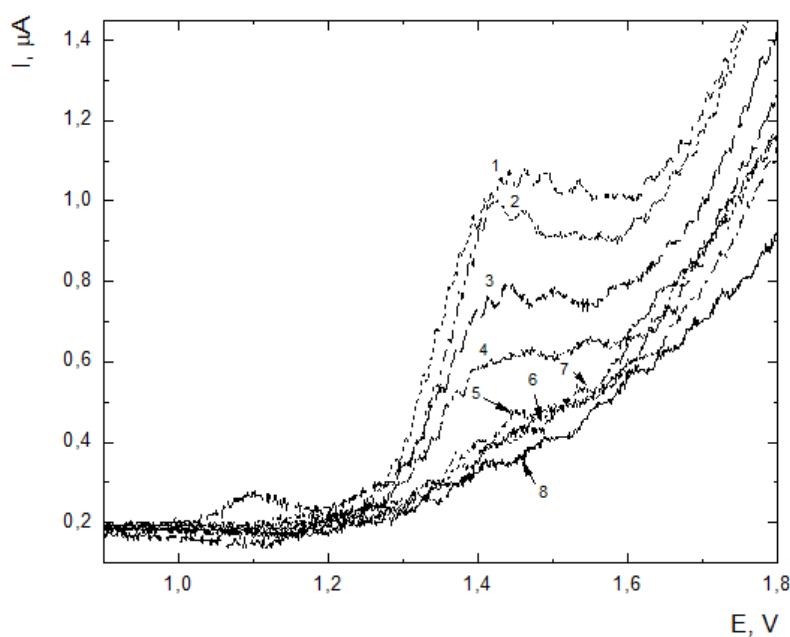
Obr. 3.4. Cyklické voltamogramy cholesterolu ($c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) v různých prostředích: (1) základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyselina fosforečná v acetonitrilu, obsahující $0,17 \%$ vody, (2) cholesterol v tomto prostředí, (3) základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyselina dusičná v acetonitrilu, obsahující $0,34 \%$ vody, (4) cholesterol v tomto prostředí, (5) základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyselina sírová v acetonitrilu, obsahující $0,04 \%$ vody, (6) cholesterol v tomto prostředí; Rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$ v acetonitrilu.

3.2. Koncentrační závislosti cholesterolu

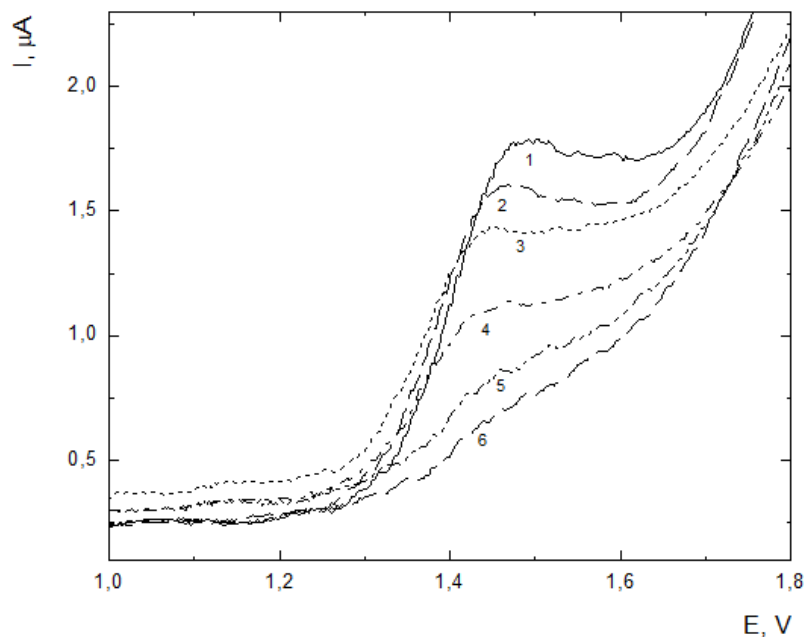
Jako základní elektrolyt byla zvolena kyselina chloristá, a to i navzdory tomu, že cholesterol poskytoval v prostředí obsahujícím kyselinu sírovou mírně vyšší proudovou odezvu. K tomuto kroku bylo přistoupeno především kvůli kompatibilitě s případným budoucím studiem směsi se žlučovými kyselinami, které s kyselinou sírovou neposkytují voltametrický signál. Ve směsném prostředí acetonitril:kyselina chloristá, s obsahem vody $0,43 \%$ byly metodami DPV a SWV na BDD elektrodě naměřeny koncentrační závislosti cholesterolu v rozsahu 4×10^{-6} až $5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ pro metodu DPV a 8×10^{-6} až $5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ pro SWV. Voltamogramy jsou uvedené na obrázcích 3.5 pro DPV a 3.6 pro SWV. Před měřením koncentračních závislostí byly optimalizovány parametry, uvedené v tabulce 3.2.

Tab. 3.2 Optimalizované parametry pro metody DPV a SWV.

Metoda	Parametr	Optimální hodnota
DPV	výška pulsu	+50 mV
	šířka pulsu	25 ms
SWV	amplituda	30 mV
	frekvence	20 Hz
	potenciálový krok	3 mV



Obr. 3.5 DP voltamogramy cholesterolu v prostředí acetonitrilu na BDD elektrodě. Koncentrace cholesterolu: (1) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (2) $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (3) $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (4) $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (5) $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (6) $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, (7) $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, (8) $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Prostředí: acetonitril: 0,1 mol l^{-1} kyselina chloristá, obsahující 0,43% vody. Rychlost polarizace 20 mV s^{-1} , výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 25 ms, potenciál měřen proti Ag/0,01 mol l^{-1} AgNO_3 /1 mol l^{-1} NaClO_4 v acetonitrilu.



Obr. 3.6 SW voltamogramy cholesterolu v prostředí acetonitrilu na BDD elektrodě. Koncentrace cholesterolu: (1) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (2) $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (3) $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (4) $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (5) $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (6) $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Prostředí: acetonitril: $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyselina chloristá, obsahující 0,43% vody. Amplituda 30 mV, frekvence 20 Hz, potenciálový krok 3 mV, potenciál měřen proti Ag/ $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ AgNO_3 / 1 mol l^{-1} NaClO_4 v acetonitrilu.

Pro obě metody byly určeny meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) (tab. 3.3, tab. 3.4) pomocí rovnic 1, 2,

$$LOD = \frac{3 \times s}{k} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{10 \times s}{k} \quad (2)$$

kde s je směrodatná odchylka, k je směrnice kalibrační závislosti.

Pro DPV je LOD roven $4,08 \times 10^{-6}$, pro SWV pak $4,74 \times 10^{-6}$. V případě SWV nebyly pozorované signály pro koncentrace nižší než $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$.

Tab. 3.3 Rovnice kalibračních přímek, pro stanovení cholesterolu DPV a SWV na BDD elektrodě ve směsném prostředí acetonitril: 0,1 mol l⁻¹ kyselina chloristá, obsahující 0,43% vody a příslušné regresní koeficienty.

Metoda	kalibrační křivka	R ²
DPV	$I [\mu\text{A}] = 14063 \times c [\text{mol l}^{-1}] - 0,1029$	0,9964
SWV	$I [\mu\text{A}] = 23734 \times c [\text{mol l}^{-1}] - 0,0594$	0,9868

Tab. 3.4 Proud píku I_p cholesterolu, včetně intervalu spolehlivosti $L_{1,2}$, ($\alpha = 0,05$) a relativní směrodatné odchylky s_r pro 10 scanů, mez detekce a mez spolehlivosti pro stanovení cholesterolu DPV a SWV na BDD elektrodě ve směsném prostředí acetonitril: 0,1 mol l⁻¹ kyselina chloristá, obsahující 0,43% vody.

Metoda	$I_p \pm L_{1,2}$ μA	s_r %	LOD mol l^{-1}	LOQ mol l^{-1}
DPV	$0,096 \pm 0,019$	19,98	$4,08 \times 10^{-6}$	$1,36 \times 10^{-5}$
SWV	$0,182 \pm 0,038$	20,62	$4,74 \times 10^{-6}$	$1,58 \times 10^{-5}$

Je zřejmé, že uvedenou metodu lze použít pro stanovení cholesterolu. Hodnoty limitu detekce/stanovitelnosti nedosahují tak nízkých hodnot jako neenzymatické metody uvedené v (28), avšak jak je patrné z tabulky 1.5, fyziologické hodnoty se pohybují v milimolárních řádech, a tedy pro účely rychlého klinického testování by metoda mohla být naprosto dostatečná.

Závěr

V souladu s literaturou (28) bylo potvrzeno, že cholesterol poskytuje v prostředí acetonitril:kyselina chloristá obsahujícím $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny chloristé a $0,43 \%$ vody irreverzibilní anodický signál v závislosti na obsahu vody mezi $+1,3$ a $+1,6 \text{ V}$ vs Ag/AgNO_3 . Bylo zjištěno, že tento signál klesá se vzrůstajícím zastoupením vody. V čase je signál stabilní. Byl studován vliv dalších anorganických kyselin (sírová, dusičná, fosforečná). Z těchto byl signál pozorován v přítomnosti sírové a dusičné. Pro konstrukci kalibračních závislostí bylo využito prostředí kyseliny chloristé. Limity detekce získané metodami DPV a SWV byly $4,08 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ respektive $4,74 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$. Tyto limity detekce jsou dostatečné pro zjišťování fyziologických hodnot cholesterolu.

Nebylo jednoznačně potvrzeno, zda lze signál připsat cholesterolu, či produktu dehydratační reakce cholesterolu a silné kyseliny. Avšak absence signálu v prostředí kyseliny fosforečné ukazuje, že je přítomnost silné kyseliny a případná následná reakce mezi ní a cholesterolem důležitým krokem. Další práce bude zaměřena na jednoznačnou identifikaci zdroje voltametrického signálu a na aplikaci této nové a nenáročné metody pro stanovení cholesterolu ve vzorcích obsahujících reálné matrice jako jsou živočišné produkty nebo krevní plazma a sérum.

Literatura

1. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: *Harperova biochemie*. Praha: H&H (2001), 490.
2. Lubanda H., Vecka M.: *Cholesterol – přítel či nepřítel?* Chem. Listy 103 (2009), 40
3. McNamara J. R., Warnick G. R., Cooper G. R.: *A brief history of lipid and lipoprotein measurements and their contribution to clinical chemistry*. Clin. Chim. Acta 369 (2006), 158.
4. Nes, W.D.: *Biosynthesis of cholesterol and other sterols*. Chem. Rev., 111 (2011), 6423.
5. Shobha H.G., Vaijinath S.K., Moti L.K.: *Niacin and cholesterol: role in cardiovascular disease (Review)*. J. Nutr. Biochem., 14 (2003), 298.
6. Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum. Výskumný ústav potravinársky. Dostupné z: <http://www.vup.sk/index.php?start> [cit. 10.03.2018].
7. Ohlsson L.: *Dairy products and plasma cholesterol levels*. Food Nutr. Res., 54 (2010), 1.
8. Racek J.: *Klinická biochemie*. Praha: Gal, Praha: Karolinum (1999), 173.
9. Varga F. *Klinická biochémia*, Martin: Osveta, (1996), 376.
10. Thompson R.H., Merola G.V.: *A simplified alternative to the AOAC official method for cholesterol in multicomponent foods*. J AOAC Int., 76, (1993), 1057.
11. Zima T.: *Laboratorní diagnostika*. Praha: Galén, (2002), 728.
12. Allain C.C., Poon L.S., Chan C.S.G., Richmond W., Fu P.C.: *Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol*. Clin. Chem., 20 (1974), 470.
- Nollet L. M. L., Toldra, F. 2012. *Food analysis by HPLC*. Boca Raton: CRC Press
13. . (2012), 169.
14. Bezine M., Namsi A., Sghaier R., Ben K.R., Hamdouni H., Brahmi F., Badreddine I., Mihoubi W., Nury T., Vejux A., Zarrouk A., de Sèze J., Moreau T., Nasser B., Lizard G.: *The effect of oxysterols on nerve impulses*. Biochemie (2018), 4.
15. Matouš B.: *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén (2010), 540.
16. Velký lékařský slovník. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/> [cit. 18.04.2018]
17. Waterham H. R.: *Inherited disorders of cholesterol biosynthesis*. Clin. Genet. 61, (2002) 393.

18. Koolman J., Röhm K.-H.: *Color Atlas of Biochemistry*, New York: Thieme Stuttgart (2005), 194.
19. Musilová J., Barek J., Pecková K.: *The use of boron-doped diamond film electrodes for detection of organic compounds*. Chem. List., 103 (2009), 469.
20. Burke R.W., Diamondstone B.I., Velapoldi R.A., and Menis O.: *Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol*. Clin. Chem. 20, (1974), 794.
21. Nath M.C., Chakravorty M.K., Chowdhury S.R.: *Liebermann-Burchard Reaction for Steroids*. Nature, 157, (1946), 103.
22. Swain G.M., Ramesham R.: *The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin film electrodes*. Anal. Chem., 65 (1993), 345.
23. Pecková K., Nesměrák K.: *Electrochemistry of bile acids, cholesterol, and related compounds (An Overview)*. Sensing in Electroanalysis., 7. (K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytrás, Eds.), (2012), 87.
24. Ferri T., Campanella L., de Angelis G.: *Differential-pulse polarographic determination of cholic acids*. Analyst., 109 (1984), 923.
25. Klouda J.: Diplomová práce. *Elektrochemická oxidace žlučových kyselin na elektrodách na bázi uhlíku. Možnosti využití v elektroanalýze*. Univerzita Karlova v Praze (2015), 33.
26. Klouda J., Barek J., Kočovský P., Herl T., Matysik F.-M., Nesměrák K., Schwarzová-Pecková K.: *Bile acids: Electrochemical oxidation on bare electrodes after acid-induced dehydration*. Electrochem. Commun., 86 (2018), 99.
27. Xiong Q., Wilson W.K., Pang J.: *The Liebermann–Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation and Rearrangement of Cholesterol in Acid*. Lipids, 42 (2007), 87.
28. Klouda J., Barek J., Nesměrák K., Schwarzová-Pecková K.: *Non-Enzymatic Electrochemistry in Characterization and Analysis of Steroid Compounds*. Crit. Rev. Anal. Chem., 47 (2017), 384.
29. Pecková K., Musilová J., Barek J. *Boron-Doped Diamond Film Electrodes—New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances*. Crit. Rev. Anal. Chem., 39, (2009), 148,
30. Dinh T.T, Thompson L.D, Galyean M.L., Brooks J.C., Patterson K.Y., Boylan L.M.: *Cholesterol Content and Methods for Cholesterol Determination in Meat and Poultry*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 10, (2011), 270.